

20031411

厚生労働科学研究研究費補助金

がん予防等健康科学総合研究事業

「白血病診断用 DNA チップの開発」に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成16(2004)年3月

厚生労働科学研究研究費補助金

がん予防等健康科学総合研究事業

「白血病診断用 DNA チップの開発」に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 間野 博行

平成16(2004)年3月

# 目次

I.	総括研究報告書	
	「白血病診断用 DNA チップの開発」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----	1
II.	分担研究報告	
1.	「白血病の網羅的遺伝子発現解析」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----	7
2.	「白血病悪性芽球バンクの整備」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・内科学講座血液 小澤 敬也 -----	9
3.	「FLT3 mutation(+)及びFLT3 wild type白血病株化細胞に対するFLT3 inhibitor, PKC412と抗白血病薬の併用効果について」に関する研究	
	栃木県立がんセンター・研究検査部 加納康彦 -----	11
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	13
IV.	研究成果の刊行物・別冊 -----	15

主任研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 教授

**研究要旨：**DNA チップを用いることで数千～数万の遺伝子に関する発現変化を比較的簡便に解析することが可能となり、これまでは鑑別診断が困難であった血液疾患の診断に役立つ新たな分子マーカーが同定されると期待される。しかし DNA チップはあまりに高感度な検査法であるため、異なった白血病患者の骨髓細胞全体を比べるような単純な解析を行うと、両患者の「骨髓中の構成細胞の違い」を反映した偽陽性結果を得ることになる。我々は広く患者さんの骨髓より造血幹細胞相当分画のみを純化し保存する「Blast Bank」を設立した。現在まで既に 500 例を超えるサンプルの保存に成功しており、本バンク細胞を用いた大規模 DNA チップ解析によって、遺伝子発現データおよび、各症例の臨床情報フォローアップデータより、初回寛解導入療法の成績にリンクする遺伝子、治療開始後 365 日の時点で寛解を維持できているか否かにリンクする遺伝子、など様々な臨床データに発現量が連関する遺伝子セットを抽出することに成功した。さらにこれら遺伝子の発現量を基に AML の新たなサブグループを定義可能なこと、またこれらサブグループが患者長期予後に連関することなども明らかにした。

分担研究者

間野博行	自治医科大学医学部ゲノム機能研究部・教授
小澤敬也	自治医科大学医学部内科学講座血液・教授
加納康彦	栃木県立がんセンター研究検査部・部長

る患者と 90%ある患者の骨髓単核球を分離して、そこから得た mRNA を用いて DNA チップ比較を行えば、白血病細胞特異的な遺伝子の発現量は後者において 14 倍に増加しているため骨髓全体の遺伝子発現プロファイルは大きく異なってしまい、両患者が全く異なった疾患に罹患しているとの誤った結論が導かれるであろう。したがって真に臨床にフィードバック可能な精度の高い DNA チップ解析を行うためには、このようなポピュレーションの変化に影響されない新たなスクリーニング法の開発が必須と考えらる。

A 研究目的

現在なお正確な診断が困難であり、かつ有効な治療法の存在しない白血病類縁疾患が数多くある。各患者の有効な治療法を選択する上でも正確な鑑別診断は必須であり、そのためには新たな分子診断マーカーの同定が最も重要であると考えられる。DNA チップは数千-数万の遺伝子発現変化を簡便に解析可能にする最新の研究システムであり、上述の目的に適したスクリーニング法であると期待される。

しかしこれまでのような正常組織と癌組織を単純に DNA チップで比較するような実験においては、両組織の構成細胞成分があまりに異なるため「偽陽性」遺伝子群の同定に終始することが殆どであった。例えば全く同じ白血病細胞が骨髓中に 5%あ

我々は白血病などの特発性血液疾患の多くが造血幹細胞（あるいはその近傍）の異常に起因することに着目し、これら疾患患者のフレッシュ検体より造血幹細胞相当分画のみを純化しストックするバンク事業「Blast Bank」をスタートした。本バンク細胞を用いて DNA チップ解析を行うことで、疾患の種類に拘わらず分化レベルがほぼ均一な細胞群を比較することが可能になり、疾患の病態解明に有用な知見が得られると期待された。本システムを用いて、(1) 白血病の鑑別診断に有効な遺伝子マーカーの同定、(2) 白血病の薬剤感受性に関与する遺伝子マーカーの同定、(3) 病期が進行する白血病類縁疾患の病期特異的分子マーカーの同定、等を本研究計画で目指した。

また同様な解析法を顆粒リンパ球増多症、多発性骨髄腫などに対しても行った。これらの膨大な知見を元に、白血病関連疾患の診断用カスタム DNA チップの開発、および新規分指標的療法の開発を行う。

## B 研究方法

- 1) 造血幹細胞特異的マーカーである AC133 に対するアフィニティカラムを用いて、白血病を含む各種特発性血液疾患患者骨髄より造血幹細胞分画を純化保存し、これを Blast Bank と名付けた。平成 16 年 3 月現在で 500 例を越えるサンプルの保存に成功しており、これは純化細胞を用いたゲノミクスプロジェクトとしては世界最大級である。
- 2) 多発性骨髄腫の解析目的で、患者骨髄より CD138 陽性形質細胞のみを純化保存する Plasma Cell Bank も行い 20 例を越えるサンプルの保存に成功した。また Natural killer (NK) 細胞性顆粒リンパ球増多症の解析目的で CD3-CD56+細胞の純化保存事業においてやはり 20 例を越える収集に成功した。さらに suppressor T 細胞性顆粒リンパ球増多症の解析目的のために CD4-CD8+T細胞分画を患者抹消血より純化し、約 10 例の収集に成功した。
- 3) 上記検体群を用いて以下のように DNA チップ解析を行った。細胞よりトータル RNA を抽出し、これを T7 RNA ポリメラーゼを用いてまず *in vitro* にて増幅した。さらにこれをもとに二本鎖 cDNA を合成し、ピオチン CTP の存在下で再び T7 RNA ポリメラーゼと反応させることで、ピオチン標識化した complementary RNA (cRNA) を作製した。このピオチン化 cRNA を DNA チップとハイブリダイズさせ、洗浄後、蛍光色素 PE 結合アビジンと反応させた。この DNA チップ上の cRNA 結合スポットを Affymetrix 社の蛍光スキャナーで励起させ、各スポットの蛍光強度を測定した後統計処理を GeneSpring 5.0 (Silicon Genetics 社) にて行った。
- 4) ヒト白血病株化細胞として U937 (AML)、K562 (Ph1+ leukemia)、MOLT3 (T-ALL)、Raji (Burkitt) を用い、各種薬剤の存在下

で 4 日間培養し、MTT assay で dose-response curve を得、IC80 における併用効果を isobologram (Steel and Peckham) で分析した。

(倫理面への配慮)

検体収集に関しては自治医科大学及び栃木県立がんセンターの生命倫理委員会認可を受けた事業として開始し、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

## C 研究結果

- 1) 我々は平成11年8月よりBlast Bankを立ち上げ既に500例を越えるサンプルのストックに成功した。現在本バンク中に130例を超える急性骨髄性白血病 (AML) 幹細胞サンプルが保存されており、世界的にも極めて貴重なリソースとなっている。これら Blast Bank分画を用いた解析が旧来の骨髄単核球全体を用いたものに比べ実際に偽陽性データが少ないこと、またバンクに用いるAC133陽性細胞がこれら疾患の責任クローンを含むことなども既に確認している
- 2) 骨髄異形成症候群由来白血病計22例およびde novo AML 28例のBlast Bankサンプルにおける網羅的遺伝子発現解析を Affymetrix社GeneChip HGU95A (>12,000ヒト遺伝子) を用いて行い、各疾患内に発現プロファイルの面から新たなサブグループ群が定義可能なこと、またこれらの鑑別診断に用いる新しい分子マーカーを10種類以上同定した (Tsutsumi *et al*, *in submission*; Oshima *et al*, *Leukemia* 17:1990, 2003)。またBlast Bankサンプルをプロテオミクス解析することにより白血病の染色体不安定性に関わる遺伝子産物の同定にも成功した。 (Ota *et al*, *Oncogene* 22: 5720, 2003)。
- 3) さらに不応性貧血から白血病への病期進展機構を明かにする目的で、不応性貧血患者及びその進行期の患者より得たBlast BankをDNAチップにて比較し、病期依存性に発現する遺伝子群を同定した。特に病期進行と共に発現が低下する遺伝子として PIASyが同定された。PIASyはsmall ubiquitin-like modifier (SUMO)を基質に結合させる酵素をコードしており、細胞内

蛋白分解系に關与する。本遺伝子を血液細胞株へ導入すると、発現上昇に伴って細胞死が誘導されることが示された。すなわち PIASyは癌抑制遺伝子として機能し、不応性貧血の悪性化を防ぐ生理的「ブレーキ」として働くことが明らかになった (Ueda et al, Br J Haematol 123: 288, 2003)。

#### 4) 全ヒトが配置されたDNAチップ

(Affymetrix HGU133A & B)を用いた解析をBlast Bank中のAML全症例について行う世界最大の白血病類縁疾患遺伝子発現データベースを構築した。これら膨大な遺伝子発現データおよび、各症例の臨床情報フォローアップデータより、初回寛解導入療法の成績にリンクする遺伝子、治療開始後365日の時点で寛解を維持できているか否かにリンクする遺伝子、など様々な臨床データに発現量が連関する遺伝子セットを抽出することに成功した。さらにこれら遺伝子の発現量を基にAMLの新たなサブグループを定義可能なこと、またこれらサブグループが患者長期予後に連関することなども明らかにした。

#### D&E. 考察及び結論

本研究事業において各種白血病類縁疾患の大規模な純化細胞DNAチップ解析を行い、膨大な遺伝子発現データを得た。これらを元に「発現量から統計的に有意に診断」を可能にする遺伝子群の抽出に成功し、カスタムDNAチップによる診断法の可能性を示した。またチップ解析の結果得られた疾患関連遺伝子のうち治療抵抗性にリンクして発現すると思われるものについては、実際の血液細胞に発現導入して薬剤反応性の変化を解析した。その結果チップ実験からピンクアルカロイド耐性遺伝子が同定された。また疾患あるいは合併症の発症に關与すると思われる遺伝子も複数単離することに成功し、これらを標的とした分子療法の開発に向けて基盤技術の開発に成功した。このように研究計画は極めて順調に推移したといえる。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

間野博行

- 1) Y.L. Choi, H. Makishima, J. Ohashi, Y. Yamashita, R. Ohki, K. Koinuma, J. Ota, Y. Isobe, F. Ishida, K. Oshimi and H. Mano. "DNA microarray analysis of natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with purified CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> fractions". *Leukemia* **18**: 556-565, 2004.
- 2) H. He, Y. Hirokawa, A. Gazit, Y. Yamashita, H. Mano, Y. Kawakami, Kawakami, C.Y. Hsieh, H.J. Kung, G. Lessene, J. Baell, A. Levitzki and H. Maruta. "The Tyr-Kinase Inhibitor AG879, That Blocks the ETK-PAK1 Interaction, Suppresses the RAS-Induced PAK1 Activation and Malignant Transformation". *Cancer Biol Ther* **3**: 2004.
- 3) K. Koinuma, K. Shitoh, Y. Miyakura, T. Furukawa, Y. Yamashita, J. Ota, R. Ohki, Y.L. Choi, T. Wada, F. Konishi, H. Nagai and H. Mano. "Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas". *Int J Cancer* **108**: 237-242, 2004.
- 4) K. Yoshida, S. Ueno, T. Iwao, S. Yamasaki, A. Tsuchida, K. Ohmine, R. Ohki, Y.L. Choi, K. Koinuma, T. Wada, J. Ota, Y. Yamashita, K. Chayama, K. Sato and H. Mano. "Screening of genes specifically activated in the pancreatic juice ductal cells from the patients with pancreatic ductal carcinoma". *Cancer Sci.* **94**: 263-270, 2003.
- 5) S. Ueno, R. Ohki, T. Hashimoto, T. Takizawa, K. Takeuchi, Y. Yamashita, J. Ota, Y.L. Choi, T. Wada, K. Koinuma, K. Yamamoto, U. Ikeda, K. Shimada and H. Mano. "DNA microarray analysis of in vivo progression mechanism of heart failure". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**: 771-777, 2003.
- 6) M. Ueda, J. Ota, Y. Yamashita, Y.L. Choi, R. Ohki, T. Wada, K. Koinuma, Y. Kano, K. Ozawa and H. Mano. "DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome". *Br J Haematol* **123**: 288-296,

- 2003.
- 7) N. Suzuki, S. Nakamura, H. Mano and T. Kozasa. "Galpha 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 733-738, 2003.
  - 8) J. Ota, Y. Yamashita, K. Okawa, H. Kisanuki, S. Fujiwara, M. Ishikawa, Y.L. Choi, S. Ueno, R. Ohki, K. Koinuma, T. Wada, D. Compton, T. Kadoya and H. Mano. "Proteomic analysis of hematopoietic stem cell-like fractions in leukemic disorders". *Oncogene* **22**: 5720-5728, 2003.
  - 9) Y. Oshima, M. Ueda, Y. Yamashita, Y.L. Choi, J. Ota, S. Ueno, R. Ohki, K. Koinuma, T. Wada, K. Ozawa, A. Fujimura and H. Mano. "DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia". *Leukemia* **17**: 1990-1997, 2003.
  - 10) K. Ohmine, T. Nagai, T. Tarumoto, T. Miyoshi, K. Muroi, H. Mano, N. Komatsu, F. Takaku and K. Ozawa. "Analysis of Gene Expression Profiles in an Imatinib-Resistant Cell Line, KCL22/SR". *Stem Cells* **21**: 315-321, 2003.
  - 11) R. Ohki, K. Yamamoto, S. Ueno, H. Mano, U. Ikeda and K. Shimada. "Effects of Olmesartan, an Angiotensin II Receptor Blocker, on Mechanically-Modulated Genes in Cardiac Myocytes". *Cardiovasc Drugs Ther* **17**: 231-236, 2003.
  - 12) R. Ohki, J. Ohashi, K. Yamamoto, S. Ueno, J. Ota, Y.-L. Choi, T. Wada, K. Koinuma, Y. Yamashita, Y. Misawa, K. Fuse, U. Ikeda, K. Shimada and H. Mano. "Prediction of cardiac function from gene expression profiles in human atrial myocytes". *J. Cell Physiol* in submission, 2003.
  - 13) Y. Ogata, M. Takahashi, S. Ueno, K. Takeuchi, T. Okada, H. Mano, S. Ookawara, K. Ozawa, B.C. Berk, U. Ikeda, K. Shimada and E. Kobayashi. "Antiapoptotic Effect of Endothelin-1 in Rat Cardiomyocytes In Vitro". *Hypertension* **41**: 1156-1163, 2003.
  - 14) N.J. Horwood, T. Mahon, J.P. McDaid, J. Campbell, H. Mano, F.M. Brennan, D. Webster and B.M. Foxwell. "Bruton's tyrosine kinase is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production". *J. Exp. Med.* **197**: 1603-1611, 2003.
- 小澤敬也
- 1) M. Ueda, J. Ota, Y. Yamashita, Y.L. Choi, R. Ohki, T. Wada, K. Koinuma, Y. Kano, K. Ozawa and H. Mano. "DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome". *Br J Haematol* **123**: 288-296, 2003.
  - 2) Y. Oshima, M. Ueda, Y. Yamashita, Y.L. Choi, J. Ota, S. Ueno, R. Ohki, K. Koinuma, T. Wada, K. Ozawa, A. Fujimura and H. Mano. "DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia". *Leukemia* **17**: 1990-1997, 2003.
  - 3) K. Ohmine, T. Nagai, T. Tarumoto, T. Miyoshi, K. Muroi, H. Mano, N. Komatsu, F. Takaku and K. Ozawa. "Analysis of Gene Expression Profiles in an Imatinib-Resistant Cell Line, KCL22/SR". *Stem Cells* **21**: 315-321, 2003.
  - 4) Y. Ogata, M. Takahashi, S. Ueno, K. Takeuchi, T. Okada, H. Mano, S. Ookawara, K. Ozawa, B.C. Berk, U. Ikeda, K. Shimada and E. Kobayashi. "Antiapoptotic Effect of Endothelin-1 in Rat Cardiomyocytes In Vitro". *Hypertension* **41**: 1156-1163, 2003.
  - 5) H. Ishii, K. Ozawa and Y. Furukawa. "Alteration of the fragile histidine triad gene early in carcinogenesis: an update". *J Exp Ther Oncol* **3**: 291-296, 2003.
  - 6) J. Ideno, H. Mizukami, K. Honda, T. Okada, Y. Hanazono, A. Kume, T. Saito, S. Ishibashi and K. Ozawa. "Persistent phenotypic correction of central diabetes insipidus using adeno-associated virus vector expressing arginine-vasopressin in Brattleboro rats". *Mol Ther* **8**: 895-902, 2003.
  - 7) H. Ishii, A. Vecchione, Y. Furukawa, K. Suthesophon, S.Y. Han, T. Druck, T. Kuroki, F. Trapasso, M. Nishimura, Y. Saito, K. Ozawa, C.M. Croce and K. Huebner. "Expression of FRA16D/WWOX and FRA3B/FHIT genes in hematopoietic malignancies".

- Mol Cancer Res* 1: 940-947, 2003.
- 8) M. Nagata, M. Takahashi, S. Muramatsu, Y. Ueda, Y. Hanazono, K. Takeuchi, K. Okada, Y. Suzuki, Y. Kondo, M. Suemori, U. Ikeda, I. Nakano, E. Kobayashi, M. Hasegawa, K. Ozawa, N. Nakatsuji and K. Shimada. "Efficient gene transfer of a simian immuno-deficiency viral vector into cardiomyocytes derived from primate embryonic stem cells". *J Gene Med* 5: 921-928, 2003.
  - 9) T. Asano, N. Ageyama, K. Takeuchi, M. Momoeda, Y. Kitano, K. Sasaki, Y. Ueda, Y. Suzuki, Y. Kondo, R. Torii, M. Hasegawa, S. Ookawara, K. Harii, K. Terao, K. Ozawa and Y. Hanazono. "Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells". *Transplantation* 76: 1061-1067, 2003.
  - 10) S. Muramatsu, L. Wang, K. Ikeguchi, K. Fujimoto, I. Nakano, T. Okada, H. Mizukami, Y. Hanazono, A. Kume and K. Ozawa. "Adeno-associated viral vectors for Parkinson's disease". *Int Rev Neurobiol* 55: 205-222, 2003.
  - 11) Y. Saga, H. Mizukami, Y. Takei, K. Ozawa and M. Suzuki. "Suppression of cell migration in ovarian cancer cells mediated by PTEN overexpression". *Int J Oncol* 23: 1109-1113, 2003.
  - 12) T. Kohno, H. Mizukami, M. Suzuki, Y. Saga, Y. Takei, M. Shimpo, T. Matsushita, T. Okada, Y. Hanazono, A. Kume, I. Sato and K. Ozawa. "Interleukin-10-mediated inhibition of angiogenesis and tumor growth in mice bearing VEGF-producing ovarian cancer". *Cancer Res* 63: 5091-5094, 2003.
  - 13) M. Urabe, K. Kogure, A. Kume, Y. Sato, K. Tobita and K. Ozawa. "Positive and negative effects of adeno-associated virus Rep on AAVS1-targeted integration". *J Gen Virol* 84: 2127-2132, 2003.
  - 14) Y. Saga, M. Suzuki, H. Mizukami, T. Kohno, Y. Takei, M. Fukushima and K. Ozawa. "Overexpression of thymidylate synthase mediates desensitization for 5-fluorouracil of tumor cells". *Int J Cancer* 106: 324-326, 2003.
  - 15) M. Kametaka, A. Kume, T. Okada, H. Mizukami, Y. Hanazono and K. Ozawa. "Reduction of CTLL-2 cytotoxicity by induction of apoptosis with a Fas-estrogen receptor chimera". *Cancer Sci* 94: 639-643, 2003.
  - 16) T. Nagai, T. Tarumoto, T. Miyoshi, K. Ohmine, K. Muroi, N. Komatsu, S. Sassa and K. Ozawa. "Oxidative stress is involved in hydroxyurea-induced erythroid differentiation". *Br J Haematol* 121: 657-661, 2003.
  - 17) Y. Hanazono, T. Asano, Y. Ueda and K. Ozawa. "Genetic manipulation of primate embryonic and hematopoietic stem cells with simian lentivirus vectors". *Trends Cardiovasc Med* 13: 106-110, 2003.
  - 18) T. Nomoto, T. Okada, K. Shimazaki, H. Mizukami, T. Matsushita, Y. Hanazono, A. Kume, K. Katsura, Y. Katayama and K. Ozawa. "Distinct patterns of gene transfer to gerbil hippocampus with recombinant adeno-associated virus type 2 and 5". *Neurosci Lett* 340: 153-157, 2003.
  - 19) A. Kume, M. Koremoto, R. Xu, T. Okada, H. Mizukami, Y. Hanazono, M. Hasegawa and K. Ozawa. "In vivo expansion of transduced murine hematopoietic cells with a selective amplifier gene". *J Gene Med* 5: 175-181, 2003.
  - 20) M. Mori, M. Uchida, T. Watanabe, K. Kirito, K. Hatake, K. Ozawa and N. Komatsu. "Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-xL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling". *J Cell Physiol* 195: 290-297, 2003.
  - 21) T. Yamaguchi, T. Okada, K. Takeuchi, T. Tonda, M. Ohtaki, S. Shinoda, T. Masuzawa, K. Ozawa and T. Inaba. "Enhancement of thymidine kinase-mediated killing of malignant glioma by BimS, a BH3-only cell death activator". *Gene Ther* 10: 375-385, 2003.
  - 22) T. Kanazawa, H. Mizukami, T. Okada, Y. Hanazono, A. Kume, H. Nishino, K. Takeuchi, K. Kitamura, K. Ichimura and K. Ozawa. "Suicide gene therapy using AAV-HSVtk/ganciclovir in combination with irradiation results in regression of human head and neck cancer xenografts in nude mice". *Gene Ther* 10: 51-58, 2003.



23) Y.Y. Lu, L.J. Wang, S. Muramatsu, K. Ikeguchi, K. Fujimoto, T. Okada, H. Mizukami, T. Matsushita, Y. Hanazono, A. Kume, T. Nagatsu, K. Ozawa and I. Nakano. "Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport". *Neurosci Res* **45**: 33-40, 2003.

24) N. Komatsu, T. Watanabe, M. Uchida, M. Mori, K. Kirito, S. Kikuchi, Q. Liu, T. Tauchi, K. Miyazawa, H. Endo, T. Nagai and K. Ozawa. "A member of Forkhead transcription factor FKHL1 is a downstream effector of STI571-induced cell cycle arrest in BCR-ABL-expressing cells". *J Biol Chem* **278**: 6411-6419, 2003.

加納康彦

1) M. Ueda, J. Ota, Y. Yamashita, Y.L. Choi, R. Ohki, T. Wada, K. Koinuma, Y. Kano, K. Ozawa and H. Mano. "DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome". *Br J Haematol* **123**: 288-296, 2003.

2) N. Nishimura, Y. Furukawa, K. Sutheesophon, M. Nakamura, K. Kishi, K. Okuda, Y. Sato and Y. Kano. "Suppression of ARG kinase activity by STI571 induces cell cycle arrest through up-regulation of CDK inhibitor p18/INK4c". *Oncogene* **22**: 4074-4082, 2003.

3) K. Mori, T. Kondo, Y. Kamiyama, Y. Kano and K. Tominaga. "Preventive effect of Kampo medicine (Hangeshashin-to) against irinotecan-induced diarrhea in advanced non-small-cell lung cancer". *Cancer Chemother Pharmacol* **51**: 403-406, 2003.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

国際公開番号：PCT/WO97/34007・発明者：間野博行・名称「PROMOTER」・出願人：間野博行、株式会社 DNAVEC 研究所・公開日：1997年9月18日

公開番号：特開 2001-269174・発明者：間野博行・名称「骨髓異形成症候群(MDS)の

検出方法及び MDS の治療剤」・出願人：間野博行・公開日：2001年10月2日

国際公開番号：PCT/WO 01/64946 A1・発明者：間野博行・名称「METHOD OF DETECTING CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA」・出願人：間野博行、宝酒造株式会社・公開日：2001年9月7日

出願番号：特願 2001-337752・発明者：間野博行・名称「多発性骨髄腫の分子診断方法」・出願人：藤沢薬品工業株式会社・出願日：2001年11月2日

出願番号：特願 2001-56438・発明者：間野博行・名称「慢性骨髄性白血病の分子診断方法」・出願人：藤沢薬品工業株式会社・出願日 2001年3月1日

分担研究者： 間野 博行 自治医科大学医学部 教授

**研究要旨：**我々は広く白血病患者骨髄より造血幹細胞相当分画のみを純化し保存する「Blast Bank」を設立した。同バンクに既に保存された 500 例を越えるサンプルの中から、急性骨髄性白血病 99 例について、全ヒト遺伝子の発現量解析を DNA チップを用いて行った。得られた膨大な遺伝子発現データおよび各症例の臨床情報フォローアップデータより、初回寛解導入療法の成績にリンクする遺伝子、治療開始後 365 日の時点で寛解を維持できているか否かにリンクする遺伝子、など様々な臨床データに発現量が連関する遺伝子セットを抽出することに成功した。さらにこれら遺伝子の発現量を基に AML の新たなサブグループを定義可能なこと、またこれらサブグループが患者長期予後に連関することなども明らかにした。

#### A 研究目的

現在なお正確な診断が困難であり、かつ有効な治療法の存在しない白血病類縁疾患が数多くある。各患者の有効な治療法を選択する上でも正確な鑑別診断は必須であり、そのためには新たな分子診断マーカーの同定が最も重要であると考えられる。DNA チップは数千-数万の遺伝子発現変化を簡便に解析可能にする最新の研究システムであり、上述の目的に適したスクリーニング法であると期待される。

我々は白血病などの特発性血液疾患の多くが造血幹細胞（あるいはその近傍）の異常に起因することに着目し、これら疾患患者のフレッシュ検体より造血幹細胞相当分画のみを純化しストックするバンク事業「Blast Bank」をスタートした。本バンク細胞を用いて DNA チップ解析を行うことで、(1) 白血病の鑑別診断に有効な遺伝子マーカーの同定、(2) 白血病の薬剤感受性に関与する遺伝子マーカーの同定、(3) 病期が進行する白血病類縁疾患の病期特異的分子マーカーの同定、等を本研究計画で目指した

#### B 研究方法

上記検体群を用いて以下のように DNA チップ解析を行った。細胞よりトータル RNA を抽出し、これを T7 RNA ポリメラーゼを用いてまず *in vitro* にて増幅した。さらにこれをもとに二本鎖 cDNA を合成し、ビオチン CTP の存在下で再び T7 RNA ポリメラーゼと反応させることで、ビオチン標識化した complementary RNA (cRNA) を

作製した。このビオチン化 cRNA を DNA チップとハイブリダイズさせ、洗浄後、蛍光色素 PE 結合アビチンと反応させた。この DNA チップ上の cRNA 結合スポットを Affymetrix 社の蛍光スキャナーで励起させ、各スポットの蛍光強度を測定した後統計処理を GeneSpring 5.0 (Silicon Genetics 社) にて行った。

(倫理面への配慮)

検体収集に関しては自治医科大学及び栃木県立がんセンターの生命倫理委員会認可を受けた事業として開始し、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

#### C 研究結果

骨髄異形成症候群由来白血病計22例および *de novo* AML 28例のBlast Bankサンプルにおける網羅的遺伝子発現解析を

Affymetrix社GeneChip HGU95A

(>12,000ヒト遺伝子)を用いて行い、各疾患内に発現プロファイルの面から新たなサブグループ群が定義可能なこと、またこれらの鑑別診断に用いる新しい分子マーカーを10種類以上同定した (Tsutsumi *et al*, *in submission*; Oshima *et al*, *Leukemia* 17:1990, 2003)。またBlast Bankサンプルをプロテオミクス解析することにより白血病の染色体不安定性に関わる遺伝子産物の同定にも成功した。(Ota *et al*, *Oncogene* 22: 5720, 2003)。全ヒトが配置されたDNAチップ (Affymetrix HGU133A & B)を用いた解析をBlast Bank中のAML全症例について行う世界最大の白血病類縁疾患遺伝子発現データベースを構築した。こ

れら膨大な遺伝子発現データおよび、各症例の臨床情報フォローアップデータより、初回寛解導入療法の成績にリンクする遺伝子、治療開始後365日の時点で寛解を維持できているか否かにリンクする遺伝子、など様々な臨床データに発現量が連関する遺伝子セットを抽出することに成功した。さらにこれら遺伝子の発現量を基にAMLの新たなサブグループを定義可能なこと、またこれらサブグループが患者長期予後に連関することなども明らかにした。

#### D&E. 考察及び結論

本研究事業において各種白血病類縁疾患の大規模な純化細胞DNAチップ解析を行い、膨大な遺伝子発現データを得た。これらを元に「発現量から統計的に有意に診断」を可能にする遺伝子群の抽出に成功し、カスタムDNAチップによる診断法の可能性を示した。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

間野博行

- 1) Y.L. Choi, H. Makishima, J. Ohashi, Y. Yamashita, R. Ohki, K. Koinuma, J. Ota, Y. Isobe, F. Ishida, K. Oshimi and H. Mano. "DNA microarray analysis of natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with purified CD3-CD56+ fractions". *Leukemia* **18**: 556-565, 2004.
- 2) K. Koinuma, K. Shitoh, Y. Miyakura, T. Furukawa, Y. Yamashita, J. Ota, R. Ohki, Y.L. Choi, T. Wada, F. Konishi, H. Nagai and H. Mano. "Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas". *Int J Cancer* **108**: 237-242, 2004.
- 3) K. Yoshida, S. Ueno, T. Iwao, S. Yamasaki, A. Tsuchida, K. Ohmine, R. Ohki, Y.L. Choi, K. Koinuma, T. Wada, J. Ota, Y. Yamashita, K. Chayama, K. Sato and H. Mano. "Screening of genes specifically activated in the pancreatic

juice ductal cells from the patients with pancreatic ductal carcinoma". *Cancer Sci.* **94**: 263-270, 2003.

- 4) M. Ueda, J. Ota, Y. Yamashita, Y.L. Choi, R. Ohki, T. Wada, K. Koinuma, Y. Kano, K. Ozawa and H. Mano. "DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome". *Br J Haematol* **123**: 288-296, 2003.
- 5) N. Suzuki, S. Nakamura, H. Mano and T. Kozasa. "Galpha 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 733-738, 2003.
- 6) J. Ota, Y. Yamashita, K. Okawa, H. Kisanuki, S. Fujiwara, M. Ishikawa, Y.L. Choi, S. Ueno, R. Ohki, K. Koinuma, T. Wada, D. Compton, T. Kadoya and H. Mano. "Proteomic analysis of hematopoietic stem cell-like fractions in leukemic disorders". *Oncogene* **22**: 5720-5728, 2003.
- 7) Y. Oshima, M. Ueda, Y. Yamashita, Y.L. Choi, J. Ota, S. Ueno, R. Ohki, K. Koinuma, T. Wada, K. Ozawa, A. Fujimura and H. Mano. "DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia". *Leukemia* **17**: 1990-1997, 2003.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

国際公開番号：PCT/WO97/34007・発明者：間野博行・名称「PROMOTER」・出願人：間野博行、株式会社 DNAVEC 研究所・公開日：1997年9月18日

公開番号：特開 2001-269174・発明者：間野博行・名称「骨髓異形成症候群(MDS)の検出方法及び MDS の治療剤」・出願人：間野博行・公開日：2001年10月2日

国際公開番号：PCT/WO 01/64946 A1・発明者：間野博行・名称「METHOD OF DETECTING CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA」・出願人：間野博行、宝酒造株式会社・公開日：2001年9月7日

分担研究者： 小澤 敬也 自治医科大学医学部 教授

**研究要旨：**DNA チップを用いることで数千～数万の遺伝子に関する発現変化を比較的簡便に解析することが可能となり、これまでは鑑別診断が困難であった血液疾患の診断に役立つ新たな分子マーカーが同定されると期待される。しかし DNA チップはあまりに高感度な検査法であるため、異なった白血病患者の骨髓細胞全体を比べるような単純な解析を行うと、両患者の「骨髓中の構成細胞の違い」を反映した偽陽性結果を得ることになる。我々は白血病などの特発性血液疾患の多くが造血幹細胞（あるいはその近傍）の異常に起因することに着目し、これら疾患患者のフレッシュ検体より造血幹細胞相当分画のみを純化しストックするバンク事業「Blast Bank」をスタートした。現在まで既に 500 例を越えるサンプルの保存に成功しており、本バンク細胞を用いた大規模 DNA チップ解析によって、白血病の新規鑑別診断マーカー遺伝子の同定に成功しただけでなく、白血病病期進展機構に関わるシグナル分子等の同定にも成功した。

#### A 研究目的

現在なお正確な診断が困難であり、かつ有効な治療法の存在しない白血病類縁疾患が数多くある。各患者の有効な治療法を選択する上でも正確な鑑別診断は必須であり、そのためには新たな分子診断マーカーの同定が最も重要であると考えられる。DNA チップは数千～数万種類の遺伝子発現変化を簡便に解析可能にする最新の研究システムであり、上述の目的に適したスクリーニング法であると期待される。

しかしこれまでのような正常組織と癌組織を単純に DNA チップで比較するような実験においては、両組織の構成細胞成分があまりに異なるため「偽陽性」遺伝子群の同定に終始することが殆どであった。例えば全く同じ白血病細胞が骨髓中に 5%ある患者と 90%ある患者の骨髓単核球を分離して、そこから得た mRNA を用いて DNA チップ比較を行えば、白血病細胞特異的な遺伝子の発現量は後者において 14 倍に増加しているため骨髓全体の遺伝子発現プロファイルは大きく異なってしまい、両患者が全く異なった疾患に罹患しているとの誤った結論が導かれるであろう。したがって真に臨床にフィードバック可能な精度の高い DNA チップ解析を行うためには、この様なポピュレーションの変化に影響されない新たなスクリーニング法の開発が必須と考えらる。

我々は白血病などの特発性血液疾患の

多くが造血幹細胞（あるいはその近傍）の異常に起因することに着目し、これら疾患患者のフレッシュ検体より造血幹細胞相当分画のみを純化しストックするバンク事業「Blast Bank」をスタートした。本バンク細胞を用いて DNA チップ解析を行うことで、疾患の種類に拘わらず分化レベルがほぼ均一な細胞群を比較することが可能になり、疾患の病態解明に有用な知見が得られると期待された。

#### B 研究方法

(1) 造血幹細胞特異的マーカーである AC133 に対するアフィニティカラムを用いて、白血病を含む各種特発性血液疾患患者骨髓より造血幹細胞分画を純化保存し、これを Blast Bank と名付けた。平成 16 年 3 月現在で 500 例を越えるサンプルの保存に成功しており、これは純化細胞を用いたゲノミクスプロジェクトとしては世界最大級である。(2) 多発性骨髓腫の解析目的で、患者骨髓より CD138 陽性形質細胞のみを純化保存する Plasma Cell Bank も行い 20 例を越えるサンプルの保存に成功した。また Natural killer (NK) 細胞性顆粒リンパ球増多症の解析目的で CD3-CD56+細胞の純化保存事業においてやはり 20 例を越える収集に成功した。さらに suppressor T 細胞性顆粒リンパ球増多症の解析目的のために CD4-CD8+T細胞分画を患者抹消血より純化し、約 10 例の収集に成功した。

#### (倫理面への配慮)

検体収集に関しては自治医科大学及び栃木県立がんセンターの生命倫理委員会認可を受けた事業として開始し、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

#### C 研究結果

平成11年8月よりBlast Bankを立ち上げ既に500例を越えるサンプルのストックに成功した。現在本バンク中に130例を超える急性骨髄性白血病 (AML) 幹細胞サンプルが保存されており、世界的にも極めて貴重なリソースとなっている。これらBlast Bank分画を用いた解析が旧来の骨髄単核球全体を用いたものに比べ実際に偽陽性データが少ないこと、またバンクに用いるAC133陽性細胞がこれら疾患の責任クローンを含むことなども既に確認している。さらに不応性貧血から白血病への病期進展機構を明かにする目的で、不応性貧血患者及びその進行期の患者より得たBlast BankをDNAチップにて比較し、病期依存性に発現する遺伝子群を同定した。特に病期進行と共に発現が低下する遺伝子としてPIASyが同定された。PIASyはsmall ubiquitin-like modifier (SUMO)を基質に結合させる酵素をコードしており、細胞内蛋白分解系に関与する。本遺伝子を血液細胞株へ導入すると、発現上昇に伴って細胞死が誘導されることが示された。すなわちPIASyは癌抑制遺伝子として機能し、不応性貧血の悪性化を防ぐ生理的「ブレーキ」として働くことが明らかになった。

#### D&E. 考察及び結論

本研究事業において各種白血病類縁疾患の大規模な純化細胞DNAチップ解析を行い、膨大な遺伝子発現データを得た。これらを元に「発現量から統計的に有意に診断」を可能にする遺伝子群の抽出に成功し、カスタムDNAチップによる診断法の可能性を示した。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) M. Ueda, J. Ota, Y. Yamashita, Y.L. Choi, R. Ohki, T. Wada, K. Koinuma, Y. Kano, K. Ozawa and H. Mano. "DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome". *Br J Haematol* **123**: 288-296, 2003.
- 2) Y. Oshima, M. Ueda, Y. Yamashita, Y.L. Choi, J. Ota, S. Ueno, R. Ohki, K. Koinuma, T. Wada, K. Ozawa, A. Fujimura and H. Mano. "DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia". *Leukemia* **17**: 1990-1997, 2003.
- 3) K. Ohmine, T. Nagai, T. Tarumoto, T. Miyoshi, K. Muroi, H. Mano, N. Komatsu, F. Takaku and K. Ozawa. "Analysis of Gene Expression Profiles in an Imatinib-Resistant Cell Line, KCL22/SR". *Stem Cells* **21**: 315-321, 2003.
- 4) Y. Ogata, M. Takahashi, S. Ueno, K. Takeuchi, T. Okada, H. Mano, S. Ookawara, K. Ozawa, B.C. Berk, U. Ikeda, K. Shimada and E. Kobayashi. "Antiapoptotic Effect of Endothelin-1 in Rat Cardiomyocytes In Vitro". *Hypertension* **41**: 1156-1163, 2003.
- 5) H. Ishii, K. Ozawa and Y. Furukawa. "Alteration of the fragile histidine triad gene early in carcinogenesis: an update". *J Exp Ther Oncol* **3**: 291-296, 2003.
- 6) J. Ideno, H. Mizukami, K. Honda, T. Okada, Y. Hanazono, A. Kume, T. Saito, S. Ishibashi and K. Ozawa. "Persistent phenotypic correction of central diabetes insipidus using adeno-associated virus vector expressing arginine-vasopressin in Brattleboro rats". *Mol Ther* **8**: 895-902, 2003.
- 7) H. Ishii, A. Vecchione, Y. Furukawa, K. Sutheesophon, S.Y. Han, T. Druck, T. Kuroki, F. Trapasso, M. Nishimura, Y. Saito, K. Ozawa, C.M. Croce and K. Huebner. "Expression of FRA16D/WWOX and FRA3B/FHIT genes in hematopoietic malignancies". *Mol Cancer Res* **1**: 940-947, 2003.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

「FLT3 mutation(+)及びFLT3 wild type 白血病株化細胞に対するFLT3 inhibitor, PKC412 と抗白血病薬の併用効果について」に関する研究

分担研究者： 加納康彦 栃木県立がんセンター 部長

**研究要旨：**FLT3(fms-like tyrosine kinase)はc-FMS、c-KIT、PDGFRと同様class III 受容体 tyrosine kinase family に属し、正常血液幹細胞や急性白血病細胞に存在、その分化、増殖の制御に重要な役割をはたしている。最近の研究で、FLT3 の mutation-internal tandem duplication (ITD)-が急性骨髄性白血病の20-30%、急性リンパ性白血病の5%以下に認められ、白血病細胞の増殖に関与していることが明らかにされた。FLT3 mutation をもつ急性骨髄性白血病は予後不良とされ、新たな治療戦略が必要とされている。PKC412 はFLT3 inhibitor のひとつで、FLT3 mutation をもつ白血病に有効であることが、実験系で示され、現在、欧米で急性白血病に対し臨床試験が進行中である。我々は白血病細胞を用いて、抗白血病薬との併用効果について検討を行った。

**A 研究目的**

FLT3(fms-like tyrosine kinase)はc-FMS、c-KIT、PDGFRと同様class III 受容体 tyrosine kinase family に属し、正常血液幹細胞や急性白血病細胞に存在、その分化、増殖の制御に重要な役割をはたしている。最近の研究で、FLT3 の mutation-internal tandem duplication (ITD)-が急性骨髄性白血病の20-30%、急性リンパ性白血病の5%以下に認められ、白血病細胞の増殖に関与していることが明らかにされた。FLT3 mutation をもつ急性骨髄性白血病は予後不良とされ、新たな治療戦略が必要とされている。PKC412 はFLT3 inhibitor のひとつで、FLT3 mutation をもつ白血病に有効であることが、実験系で示され、現在、欧米で急性白血病に対し臨床試験が進行中である。私達は白血病細胞を用いて、抗白血病薬との併用効果について検討を行った。

**B 研究方法**

**細胞：**FLT3 mutation をもつ急性白血病細胞として、MOLM13、MOLM14を用い、FLT3 wild type の細胞としてKG-1細胞を用いた。

**抗がん剤：**PKC412 の併用薬として急性白血病の治療薬のdoxorubicin, idarubicin, mitoxantrone, cytarabine, etoposide, 4-hydroperoxy cyclophosphamide, methotrexate, vincristineを用いた。

**培養：**ヒト白血病株化細胞をPKC412 と他

剤の存在下で4日間培養し、MTT assay でdose-response curve を得、IC<sub>50</sub>における併用効果を isobologram (Steel and Peckham)で分析した。

(倫理面への配慮)

一般に使用されている株化細胞を用いた実験のため不要。

**C 研究結果**

FLT3 mutationをもつMOLM13及びMOLM14はPKC412に対する感受性が極めて高く、IC<sub>50</sub>は30~40 nMで、FLT3 wild typeのKG-1は400 nMであった。その他、NALM20、K562、HL60、U937、MOLT3、HS Sultan等のFLT3 wild type及びFLT3(-)の細胞は >1000 nMであった。この実験よりPKC412の併用実験はMOLM13及びMOLM14、KG-1を用いておこなった。

MOLM13及びMOLM14細胞による併用実験では、PKC412はidarubicin, doxorubicin, mitoxantrone, cytarabine, vincristineと相乗作用、4-hydroperoxy cyclophosphamideと相加作用、methotrexateと拮抗作用を示した。一方、KG-1細胞を用いた併用実験では、PKC412はvincristineと相乗作用、4-hydroperoxy cyclophosphamideと相加作用、idarubicin, doxorubicin, mitoxantrone, cytarabine, methotrexateと拮抗作用を示した。

**D&E. 考察及び結論**

FLT3 mutationをもつ MOLM13 及び

MOLM14はFLT3 wild type やFLT3 (-)の細胞に比べ、PKC412に対し強い感受性を示した。これはPKC412のFLT3 mutationをもつ白血病に対しする選択的分子標的療法としての可能性を示している。PKC412の併用実験ではFLT3 mutation(+)のMOLM13及びMOLM14細胞とFLT3 wild typeのKG-1細胞で、ともにvincristineと相乗作用、4-hydroperoxy cyclophosphamideと相加作用、methotrexateと拮抗作用を示した。しかし、興味あることにPKC412はanthracycline系薬剤やetoposide、cytarabineに対しは全く異なった併用効果態度を示した。すなわち、MOLM13及びMOLM14細胞に対してPKC412はこれらの薬剤と相乗作用を示し、KG-1細胞ではいずれも拮抗作用を示した。

このことから臨床においてもPKC412とanthracycline系薬剤やetoposide、cytarabineとの同時投与はFLT3 mutation(+)白血病に対して強い抗白血病効果を示し、FLT3 mutation(-)白血病に対しては抗白血病効果を半減させる可能性が強い。急性白血病に対しPKC412の併用臨床試験を行う場合、治療前に白血病細胞のFLT3 mutationの有無を調べ、mutation(+)白血病に限り、PKC412とanthracycline系薬剤やetoposide、cytarabineとの同時併用を行う必要がある。もう少し多くの株化細胞で検討する必要があるが、私達の実験結果はPKC412の併用臨床試験のプロトコール作成に重要な情報を提供すると思われる。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ueda M, Ota J, Yamashita Y, Choi YL, Ohki R, Wada T, Koinuma K, Kano Y, Ozawa K, Mano H. DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 2003 Oct;123(2):288-296.
- 2) Nishimura N, Furukawa Y, Sutheesophon K, Nakamura M, Kishi K, Okuda K, Sato Y, Kano Y. Suppression of

ARG kinase activity by STI571 induces cell cycle arrest through up-regulation of CDK inhibitor p18/INK4c. *Oncogene.* 2003 Jun 26;22(26):4074-4082.

- 3) Mori K, Kamiyama Y, Kondo T, Kano Y, Tominaga K. Phase II study of the combination of vinorelbine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004 Feb;53(2):129-132.
- 4) Mori K, Kondo T, Kamiyama Y, Kano Y, Tominaga K. Preventive effect of Kampo medicine (Hangeshashin-to) against irinotecan-induced diarrhea in advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003 May;51(5):403-6.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

刊行リスト - 論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Choi, Y.L. et al.	DNA microarray analysis of natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with purified CD3-CD56+ fractions	Leukemia		18 556-565	2004
He, H. et al.	The Tyr-Kinase Inhibitor AG879, That Blocks the ETK-PAK1 Interaction, Suppresses the RAS-Induced PAK1 Activation and Malignant Transformation	Cancer Biol Ther		3	2004
Horwood, N.J. et al.	Bruton's tyrosine kinase is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production.	J. Exp. Med.		197 1603-1611	2003
Koinuma, K. et al.	Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas	Int J Cancer		108 237-242	2004
Ogata, Y. et al.	Antiapoptotic Effect of Endothelin-1 in Rat Cardiomyocytes In Vitro <sup>®</sup> . Hypertension	Hypertension		41 1156-1163	2003
Ohki, R. et al.	Effects of Olmesartan, an Angiotensin II Receptor Blocker, on Mechanically-Modulated Genes in Cardiac Myocytes	Cardiovasc Drugs Ther		17 231-236	2003
Ohki, R. et al.	Prediction of cardiac function from gene expression profiles in human atrial myocytes.	J. Cell Physiol in submission			2003
Ohmine, K. et al.	Analysis of Gene Expression Profiles in an Imatinib-Resistant Cell Line, KCL22/SR	Stem Cells		21 315-321	2003
Oshima, Y. et al.	DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia	Leukemia		17 1990-1997	2003
Ota, J. et al.	Proteomic analysis of hematopoietic stem cell-like fractions in leukemic disorders	Oncogene		22 5720-5728	2003
Suzuki, N. et al.	Galpha 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA		100 733-738	2003
Ueda, M. et al.	DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome	Br J Haematol		123 288-296	2003
Ueno, S. et al.	DNA microarray analysis of in vivo progression mechanism of heart failure	Biochem. Biophys. Res. Commun		307 771-777	2003
Yoshida, K. et al.	Screening of genes specifically activated in the pancreatic juice ductal cells from the patients with pancreatic ductal carcinoma	Cancer Sci		94 263-270	2003
Ogata, K. et al.	Expression of human coagulation factor VIII in adipocytes transduced with the simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vector for hemophilia A gene therapy.	Gene Ther		11 253-259	2004
Yamaguchi, T. et al.	Enhancement of thymidine kinase-mediated killing of malignant glioma by BirnS, a BH3-only cell death activator.	Gene Ther		10 375-385	2003
Urabe, M. et al.	Positive and negative effects of adeno-associated virus Rep on AAVS1-targeted integration.	J Gen Virol		84 2127-2132	2003
Ueda, M. et al.	DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome.	Br J Haematol		123 288-296	2003
Saga, Y. et al.	Suppression of cell migration in ovarian cancer cells mediated by PTEN overexpression.	Int J Oncol		106 324-326	2003
Saga, Y. et al.	Suppression of cell migration in ovarian cancer cells mediated by PTEN overexpression.	Int J Oncol		23 1109-1113	2003
Oshima, Y. et al.	DNA microarray analysis of hematopoietic stem cell-like fractions from individuals with the M2 subtype of acute myeloid leukemia.	Leukemia		17 1990-1997	2003
Ohmine, K. et al.	Analysis of gene expression profiles in an imatinib-resistant cell line, KCL22/SR.	Stem Cells		21 315-321	2003
Ogata, Y. et al.	Antiapoptotic effect of endothelin-1 in rat cardiomyocytes in vitro. Hypertension	Hypertension		41 1156-1163	2003
Nomoto, T. et al.	Distinct patterns of gene transfer to gerbil hippocampus with recombinant adeno-associated virus type 2 and 5.	Neurosci Lett		340 153-157	2003



Noborio, K. et al.	Massive immune hemolysis after non-myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with minor ABO-incompatibility.	Leuk Lymphoma	44	357-359	2003
Nagata, M. et al.	Efficient gene transfer of a simian immuno-deficiency viral vector into cardiomyocytes derived from primate embryonic stem cells.	J Gene Med	5	921-928	2003
Nagai, T. et al.	Oxidative stress is involved in hydroxyurea-induced erythroid differentiation.	Br J Haematol	121	657-661	2003
Muramatsu, S. et al.	Adeno-associated viral vectors for Parkinson's disease.	Int Rev Neurobiol	55	205-222	2003
Mori, M. et al.	Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-xL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling.	J Cell Physiol	195	290-297	2003
Lu, Y.Y. et al.	Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport.	Neurosci Res	45	33-40	2003
Kume, A. et al.	In vivo expansion of transduced murine hematopoietic cells with a selective amplifier gene.	J Gene Med	5	175-181	2003
Komatsu, N. et al.	A member of Forkhead transcription factor FKHL1 is a downstream effector of STI571-induced cell cycle arrest in BCR-ABL-expressing cells.	J Biol Chem	278	6411-6419	2003
Kohno, T. et al.	Interleukin-10-mediated inhibition of angiogenesis and tumor growth in mice bearing VEGF-producing ovarian cancer.	Cancer Res	63	5091-5094	2003
Kanazawa, T. et al.	Suicide gene therapy using AAV-HSVtk/ganciclovir in combination with irradiation results in regression of human head and neck cancer xenografts in nude mice.	Gene Ther	10	51-58	2003
Kametaka, M. et al.	Reduction of CTLL-2 cytotoxicity by induction of apoptosis with a Fas-estrogen receptor chimera.	Cancer Sci	94	639-643	2003
Itoh, A. et al.	A soluble CAR-SCF fusion protein improves adenoviral vector-mediated gene transfer to c-Kit-positive hematopoietic cells.	J Gene Med	5	929-940	2003
Ishii, H. et al.	Expression of FRA16D/WWOX and FRA3B/FHIT genes in hematopoietic malignancies.	Mol Cancer Res	1	940-947	2003
Ishii, H. et al.	Alteration of the fragile histidine triad gene early in carcinogenesis: an update.	J Exp Ther Oncol	3	291-296	2003
Ideno, J. et al.	Persistent phenotypic correction of central diabetes insipidus using adeno-associated virus vector expressing arginine-vasopressin in Brattleboro rats.	Mol Ther	8	1061-1067	2003
Hanazono, Y. et al.	Genetic manipulation of primate embryonic and hematopoietic stem cells with simian lentivirus vectors.	Trends Cardiovasc Med	13	106-110	2003
Asano, T. et al.	Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells.	Transplantation	76	1061-1067	2003
Mori, K. et al.	Phase II study of the combination of vinorelbine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer.	Cancer Chemother Pharmacol	53	129-132	2004
Ueda, M. et al.	DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome.	Br J Haematol	123	288-296	2003
Nishimura, N. et al.	Suppression of ARG kinase activity by STI571 induces cell cycle arrest through up-regulation of CDK inhibitor p18/INK4c.	Oncogene	22	4074-4082	2003
Mori, K. et al.	Preventive effect of Kampo medicine (Hangeshashin-to) against irinotecan-induced diarrhea in advanced non-small-cell lung cancer.	Cancer Chemother Pharmacol	51	403-406	2003

20031411

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。